

p-633-1 (11)

METHOD FOR FREEZING AND STORING CELL OF TISSUE OF ORGANISM

Patent number: JP6292564
Publication date: 1994-10-21
Inventor: NISHIZAWA HIDEJI; AMANO YOSHIHIKO;
MATSUZAWA TSUNETOMO; SAKAI AKIRA
Applicant: NAGANO PREF GOV NOUSON KOGYO K
Classification:
- international: **A01N1/00; C12N1/04; C12N5/04; C12N5/06; A01N1/00;**
C12N1/04; C12N5/04; C12N5/06; (IPC1-7): C12N5/04;
A01N1/00; C12N1/04; C12N5/06
- european:
Application number: JP19930081018 19930408
Priority number(s): JP19930081018 19930408

[Report a data error here](#)**Abstract of JP6292564**

PURPOSE: To freeze and store the cells or tissue of an organism without damage by treating the cells or tissue of the organism with an aqueous solution containing glycerol and sucrose and subsequently freezing the treated cells or tissue at a cryogenic temperature. **CONSTITUTION:** The cells or tissue of an organism are treated with an aqueous solution containing 20-70w/v% of glycerol and 10-70w/v% of sucrose and subsequently frozen at a cryogenic temperature. The method does not require DMSO which is a chemical injurious to the organisms.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-292564

(43) 公開日 平成6年(1994)10月21日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/04				
A 0 1 N 1/00		9159-4H		
C 1 2 N 1/04		7236-4B		
5/06				
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	Z
			審査請求 未請求	請求項の数3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-81018

(22) 出願日 平成5年(1993)4月8日

(71) 出願人 591062146

社団法人長野県農村工業研究所
長野県須坂市大字須坂787-1

(72) 発明者 西澤 秀治

長野県須坂市大字須坂787の1 社団法人
長野県農村工業研究所内

(72) 発明者 天野 良彦

長野県須坂市大字須坂787の1 社団法人
長野県農村工業研究所内

(72) 発明者 松澤 恒友

長野県須坂市大字須坂787の1 社団法人
長野県農村工業研究所内

(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物の細胞または組織の凍結保存法

(57) 【要約】

【構成】 生物の細胞または組織をグリセリン20～70% (w/v、以下同じ) およびショ糖10～70% および所望によりを多価アルコール5～10%含有する水溶液からなる凍害防御液に浸漬し、次いでこれを極低温で凍結させる細胞または組織の凍結保存法。

【効果】 高価な機械器具や煩雑な操作を必要とせず、また有害なDMSOを使用することなく、極めて簡便に短時間で生物の細胞や組織を極低温で凍結保存することができる。この方法により凍結保存された細胞や組織は極めて優れた再生率を示す。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物の細胞または組織をグリセリン20～70% (w/v、以下同じ) およびショ糖10～70%を含有する水溶液からなる凍害防御液で処理し、次いでこれを極低温下で凍結させることを特徴とする生物の細胞または組織の凍結保存法。

【請求項2】 生物の細胞または組織をグリセリン20～70%、ショ糖10～70%および多価アルコール5～10%を含有する水溶液からなる凍害防御液で処理し、次いでこれを極低温下で凍結させることを特徴とする細胞または組織の凍結保存法。

【請求項3】 細胞または組織が耐凍性を高めるための前培養をしたものである請求項1または2に記載の生物の細胞または組織の凍結保存法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は生物の細胞または組織を極低温下で凍結保存する改良方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年バイオテクノロジーの発達とともに、生物の遺伝子資源の確保が重要となり、動物、植物、微生物等の細胞や組織を永久的に保存することが必要とされるようになった。

【0003】 従来、牛の精液あるいは植物の種子や花粉を液体窒素のような極低温下で凍結保存することは知られているが、植物の組織やカルス等を極低温で凍結保存することは困難であった。生物の細胞や組織を常温や低温から液体窒素のような極低温に冷却した場合には、細胞外凍結や細胞内凍結により細胞や組織は物理的な損傷を受ける。この損傷を防ぐためには細胞や組織の水分を凍害防御液と交換して凍結保存する必要がある。従来凍結保存法として緩速予備凍結保存法が知られている。これは、ジメチルスルホキシド (DMSO) 5～15% (w/v、以下同じ)、グリセリン0～15%、エチレングリコールなどの多価アルコール0～15%およびショ糖0～15%の水溶液からなる凍害防御液に細胞または組織を1.5時間程度浸漬して平衡状態とした後、該細胞または組織の温度を1分間当たり0.3℃ずつ下げ、-5～-7℃で植氷し、ついで-40℃にまで下げ、-40℃で1時間程度保持した後に液体窒素中に投入して凍結させ保存する。解凍は温水中で急速に融解させ、凍害防御液を洗浄除去した後再生させる。

【0004】 ところが緩速予備凍結保存法は、温度をコントロールしながら徐々に低下させるため、高価なプログラムフリーザーが必要であり、また-40℃まで冷却するのに約1時間半ほどかなり多量の液体窒素を必要とする。さらに凍害防御処理するのに約1時間半ほどかかる。凍結保存処理も煩雑で1回の処理に3～4時間を必要とするなど多くの欠点を有している。

【0005】 他の凍結保存法としてガラス化法があり、

2

これはグリセリン30%、エチレングリコール15%、DMSO15%およびショ糖14%を含有するガラス化液からなる凍害防御液に細胞または組織を浸漬処理した後、液体窒素等の極低温下で急速に冷却し、凍結保存する方法である。しかしながらこの方法はまだ成功した例が少ない。これらの方法のほかに乾燥法も知られているが実施例は少ない。

【0006】 緩速予備凍結保存法もガラス化法とともに融解時の再生率をよくするため凍害防御剤としてDMSOを使用することが不可欠であるが、DMSOは低濃度であっても生物の組織細胞の生育を阻害することが知られており、前処理や凍結保存後の融解時における葉害や遺伝子の変異等が懸念されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、高価なプログラムフリーザーや特別な機械器具を必要とせず、また生物に有害な薬品であるDMSOを使用しないで生物の細胞や組織を損傷させることなく極低温下で凍結保存する方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、生物の細胞または組織をグリセリン20～70% (w/v、以下同じ) およびショ糖10～70%を含有する水溶液からなる凍害防御液で処理し、次いでこれを極低温下で凍結させることを特徴とする生物の細胞または組織の凍結保存法である。上記凍害防御液にはさらに多価アルコール5～10%を含有させるのがよい場合もある。細胞または組織は耐凍性を高めるための前培養をしたものを使用するのが望ましい。

【0009】 本発明において、被保存物である生物の細胞または組織には特に限定はなく、動物、植物、微生物等の細胞や組織が凍結保存され得る。被保存物の好ましい例としては、牛、馬等動物の精子、カルス、苗条原基、生長点、種子等植物の各種組織、真菌類の菌糸等があげられる。ここに苗条原基とは、植物の茎頂を0.2～0.5mmの大きさに切り出し、低～中濃度のオーキシンとサイトカイニンを加えた液体培地で垂直方向の回転培養 (2rpm) を行い、得られた多数の生長点原基を持った金平糖状の組織塊をいう。苗条原基を誘導・増殖させた後、苗条を生長させる苗条原基誘導法を用いて、三倍体スイカ、雑種強勢トモロコシおよびイネ等の一年生植物を多年生化し短時間に大量増殖させる方法が知られている (特公昭59-132823号公報)。本発明においてはこの苗条原基も好適に使用される。

【0010】 植物や微生物はそれぞれに適する人工培地で無菌的に育成するのがその後の取り扱いが容易であり望ましい。これらは比較的若い組織や細胞で活性が高く、特に対数増殖期のものが望ましい。植物の細胞や組織は一般的には耐凍性が低いので、これを高めるために前培養を行うのが好ましい。例えば、生長点や苗条原基

を凍結保存するときは、凍結処理を行う前に5〜35%のソルビトール、ショ糖またはマンニトールで前培養を1〜5日行い、耐凍性を高めると凍結保存後の生存率が飛躍的に向上することが多い。植物の苗条原基等は5mm程度の適当な大きさに均一に揃えるのがよい。

【0011】本発明における凍害防御液は前述したように、グリセリンおよびショ糖を含有する水溶液からなる。グリセリンは20〜70% (2.2〜7.6M) 程度、ショ糖は10〜70% (0.3〜2.0M) 程度の濃度である。グリセリン濃度を40〜60%とし、ショ糖濃度を40〜60%とするのが好ましい。被保存物が高い浸透圧に対する抵抗力が弱い場合はできるだけ薄い濃度を用いる。凍害防御液がショ糖を含有しないと凍結保存後の再生率が著しく低下する。本発明における凍害防御液がさらに多価アルコールを含有すると再生率が一層向上することもある。多価アルコールの好適な例としては、エチレングリコール、プロピレングリコールなどがあげられる。多価アルコールの濃度は5〜10%が好ましい。凍害防御液は、所定濃度の上記各成分を常法にしたがって水または培養液に加えて溶解させることによって容易に調製される。細胞または組織の凍害防御液による処理は、通常、被保存物を凍害防御液に浸漬することによって実施される。浸漬する時の凍害防御液の温度には、特に限定はないが0〜25℃程度が好ましい。浸漬時間は、凍害防御液の温度や被保存物の大きさにもよるが通常10〜30分間である。浸漬時間が不十分であると細胞や組織からの脱水が不十分となり、凍結したときに細胞や組織に損傷を与える。浸漬時間が長すぎると細胞や組織を枯死させる。低温処理する場合は0℃が操作が容易であり、被保存物にもよるが、植物のカルスの場合には0℃で30分程度、苗条原基や生長点で30〜90分が適当である。25℃で処理する場合は、0℃のときの半分程度の浸漬時間とする。

【0012】凍害防御液に浸漬した被保存物は−120℃以下の極低温下に晒すことにより、凍結保存する。好ましくは市販のクライオチューブ (ナルゲン社製) 等の極低温に耐える適当な容器に被保存物および凍害防御液を入れ、液体窒素に投入し、急速に冷却し、そのまま保存する。凍結保存物を融解するには、容器ごと、10℃程度の温水に入れ、急速に解凍する。ゆっくり融解すると、融解中に水が再結晶し、細胞や組織に損傷を与える。融解された植物や微生物の細胞・組織は凍害防御液を除去し、15〜40%の高濃度ショ糖に暫時浸漬した後適当な固形培地に置床し、数時間後新しい培地に移すと3〜5日目から増殖を始める。

【0013】

【実施例】次に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

【0014】【実施例1】アスパラガス (学名 *Asparagus officinalis* L.) の組織をカルス形成培地に置床し、得られた体細胞胚を形成する能力のあるカルス (エンブリオジェニックカルス) を、グリセリン20%とショ糖15%からなる前処理液に25℃で10分間浸漬した。前処理液を除いたあとカルスをクライオチューブに移し、これにグリセリン50%とショ糖50%からなる凍害防御液を入れ0℃で20分間放置した。その後液体窒素にすばやく浸漬して凍結保存した。解凍はチューブを40℃の温水にいれ、40%のショ糖でカルスを洗浄することにより行った。カルスを増殖培地に置床すると5日には増殖をはじめ、このカルスをホルモンフリーの培地に移すことにより植物体再生固体を得た。

【0015】【実施例2】ポテトデキストロースアガー培地 (PDA培地) で培養したエノキタケ (学名 *Flammulina velutipes*) の菌糸を5mm角に切りとり、クライオチューブに該菌糸と実施例1で使用したものと同じ凍害防御液とを入れ、0℃で20分間放置したのち液体窒素にすばやく漬けた。解凍はクライオチューブを40℃の湯の中に入れ急速にあたためることにより行った。菌糸をとりだし、35%ショ糖に10分間浸漬した後、PDA培地に置床すると4日目より菌糸が伸長ははじめ、これを人工栽培することにより子実体を得た。

【0016】【実施例3】チコリーの生長点をベンジルアデニン2ppmを含むMS液体培地で培養することにより得られた苗条原基を用い、ソルビトール10%で前培養し、これをグリセリン20%とショ糖15%からなる前処理液で25℃で30分間処理した。次いでこれをグリセリン50%およびショ糖50%からなる凍害防御液に浸漬し、25℃で30分間置いた後液体窒素に浸漬し凍結保存した。解凍は35%ショ糖を含む苗条原基培養培地で凍害防御液を取り除き、濾紙2枚をおいた寒天培地上へ移し3時間放置することにより行った。苗条原基は発芽培地上で7日目には苗条原基から茎葉が認められ植物体が再生できた。

【0017】

【発明の効果】本発明によれば、高価な機械器具や煩雑な操作を必要とせず、また有害なDMSOを使用することなく、極めて簡便に短時間で生物の細胞や組織を極低温で凍結保存することができる。

【0018】本発明の方法により凍結保存された細胞や組織は極めて優れた再生率を示す。

(4)

特開平6-292564

フロントページの続き

(72)発明者 酒井 昭

北海道札幌市北区麻生町1-5-23